

AP20 Rec'd PCT/PTO 30 MAY 2006

**NOUVELLES SONDES HYBRIDES À LUMINESCENCE EXALTÉE**

La présente invention concerne le domaine technique des sondes pour la détection, le suivi et la quantification dans les systèmes biologiques. Plus particulièrement, l'invention a pour objet de nouvelles particules sondes hybrides  
5 dont le cœur est constitué par une nanoparticule d'or sur laquelle sont immobilisées d'une part des molécules sondes et d'autre part des molécules à activité luminescente, ainsi que leur procédé de préparation.

L'emploi de sondes associées à un marqueur, dans les systèmes biologiques pour la détection (reconnaissance) ou le suivi de substances spécifiques, appelées  
10 cibles, est une technique usuelle dans le domaine du diagnostic médical et de la recherche en biologie. De telles sondes sont particulièrement utilisées pour la cytométrie de flux, l'histologie, les tests immunologiques ou la microscopie de fluorescence aussi bien pour l'étude de matériaux biologiques que de matériaux non biologiques.

Des systèmes de marquage usuels sont par exemple des isotopes radioactifs de l'iode, du phosphore et d'autres éléments comme l'enzyme peroxydase ou la phosphatase alcaline dont la détection nécessite un substrat particulier. Dans la plupart des cas, le couplage sélectif entre le marqueur et la substance à détecter est effectué par une seule ou une association de molécules fonctionnelles. La sélectivité  
20 de la liaison est essentielle afin d'identifier sans ambiguïté la substance cible à détecter. Les réactions assurant le couplage sont connues et décrites par exemple dans « Bioconjugate Techniques », G. T. Hermanson, Academic Press, 1996 ou dans « Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis », Second Edition, W. T. Mason, ed., Academic Press, 1999.  
25

Les colorants organiques fluorescents sont très utilisés pour le marquage. Il s'agit de la fluorescéine, du Texas Red ou de Cy5, qui sont sélectivement liés à une substance biologique ou organique déterminée jouant le rôle de sonde. Après excitation de la sonde marquée par une source externe, le plus souvent  
30 électromagnétique, la présence des substances biologiques ou organiques cibles liées à la sonde est mise en évidence par l'émission de fluorescence de la part de cette dernière.

L'abaissement des seuils de détection constitue un objectif majeur qui permettrait de déboucher sur l'amélioration des biopuces (analyse et identification de biomolécules) et sur le développement de sondes plus performantes capables  
5 d'assurer la traque individuelle de biomolécules cibles, afin d'étudier leur activité cellulaire, ou capables de mettre en évidence les interactions existant entre des êtres unicellulaires (bactéries, protozoaires..) et des minéraux qui se manifestent par des modifications physico-chimiques locales de l'environnement (variation du pH, de la force ionique, de la concentration en oxygène).

10 La limitation actuelle à l'abaissement des seuils de détection réside dans la difficulté de fonctionnaliser une biomolécule ou un site particulier d'un substrat biologique, constituant la cible à détecter, par plus d'une fonction (le plus souvent une molécule) organique fluorescente.

Pour abaisser le seuil de détection, il est proposé dans l'art antérieur de  
15 marquer la sonde destinée à se lier avec la cible à détecter, avec des particules intrinsèquement luminescentes. En particulier, des nanoparticules de matériau semi-conducteur ont donné lieu à d'intenses recherches. Le brevet US 5,990,479, et les demandes de brevet internationales publiées sous le numéro WO 00/17642 et WO 00/29617 montrent que les nanocristaux semiconducteurs fluorescents, qui  
20 appartiennent à la classe des éléments II-VI ou III-V et ceux qui, sous certaines conditions, sont composés des éléments du 4<sup>ème</sup> groupe principal du tableau périodique, peuvent être utilisés comme marqueur fluorescent pour les systèmes biologiques. En raison du phénomène connu sous le vocable « quantum size effect », la longueur d'onde d'émission d'un nanocristal semiconducteur fluorescent est  
25 imposée par sa taille. Ainsi, en faisant varier la taille de ces nanocristaux, une large gamme du spectre peut être couverte, de la lumière visible au proche infra-rouge. Leur utilisation comme marqueur biologique est décrit par Warren C.W. Chan, Shuming Nie, Science, 281, 2016-2018, 1998, et par Marcel Bruchez Jr, Mario Moronne, Peter Gin, Shimon Weiss, A. Paul Alivisatos, Science, 281, 2013-2016,  
30 1998. La préparation de nanocristaux semiconducteurs avec une longueur d'onde d'émission bien définie, c'est-à-dire avec une faible dispersion en taille, exige une très grande précision et nécessite une parfaite maîtrise des conditions opératoires et

du déroulement de la synthèse. Ils sont, par conséquent, très difficiles à produire. La palette étendue de couleurs qu'offrent ces cristaux semiconducteurs résulte d'une variation de taille de l'ordre de quelques Angström (c'est-à-dire quelques couches atomiques). Les synthèses en solution permettent rarement d'atteindre un tel degré de  
5 précision. De plus, la recombinaison de paires électron-trou observée à la surface des nanocristaux limite le rendement quantique à une faible valeur.

Pour contourner ce problème, une structure cœur / coquille (« core / shell ») a été proposée : il s'agit d'enrober individuellement les nanocristaux semiconducteurs fluorescents par une couche de matériau semi-conducteur avec un plus large gap  
10 (ZnS, CdS). De plus, le marquage sélectif de biomolécules par des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents nécessite la formation d'une couche de polysiloxane fonctionnalisé par des groupes amines (époxy et acide carboxylique). Ces derniers constitueront des points d'ancrage pour les biomolécules. La préparation de ces nanocristaux demande, donc, au moins trois étapes de synthèse dont les deux  
15 premières sont très délicates et est donc difficilement industrialisable.

Le marquage par des nanoparticules d'oxyde rendues luminescentes grâce au dopage par des ions luminescents (terre rare) n'est pas, malgré des résultats prometteurs, encore très répandu. Son principal inconvénient réside dans le faible rendement quantique qui nécessite l'utilisation d'un laser pour exciter les ions  
20 luminescents présents dans la matrice cristalline. D'autre part, les propriétés de luminescence sont très nettement altérées, lorsque ces particules sont utilisées directement en milieu aqueux.

Le marquage par des vésicules ou billes polymères, ou de polysiloxanes, remplies de composés organiques luminescents est efficace pour la visualisation en  
25 luminescence, mais nécessite souvent des particules assez grandes (plusieurs dizaines de nanomètres) et reste délicat à employer dans certaines applications où une plus grande « molécularité » est recherchée.

Différentes stratégies faisant appel à des particules d'or greffées ont déjà été développées. Aucune cependant n'a réussi à augmenter, de façon satisfaisante, la  
30 luminescence émise. La plupart des travaux a été focalisée sur le marquage et la détection d'oligonucléotides dont une des extrémités a été modifiée par une fonction thiol. Si le greffage d'un brin d'oligonucléotide constitue une étape commune des

différentes stratégies recensées dans l'art antérieur, les moyens mis en œuvre pour la détection sont très variables.

En effet, Pileni *et al.* dans J. Phys. Chem B, 107, 27, 6497-6499, 2003 décrivent l'immobilisation de nanoparticules fonctionnalisées par des brins d'oligonucléotide thiolés par hybridation avec le brin complémentaire présent sur des îlots nanométriques d'or déposés sur une surface de verre. L'immobilisation (et par conséquent la détection de l'oligonucléotide) est mise en évidence par une augmentation importante de la sensibilité de la spectroscopie en transmission de résonance du plasmon de surface (T-SPR). La détection électrochimique d'oligonucléotides a également été envisagée par Li *et al.* dans Analyst, 128, 917-923, 2003 et Hsing *et al.* dans Langmuir 19, 4338-4343, 2003. L'immobilisation de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des brins d'oligonucléotide sur des biopuces (par hybridation) facilite la germination de cristaux d'argent (par réduction des sels de cations argent (I)) induisant une augmentation du courant de détection.

Les propriétés optiques de l'or ont également été mises à profit pour le marquage et la détection. Ainsi, Richards-Kortum *et al.* dans Cancer Research, 63, 1999-2004, 2003, ont montré que des nanoparticules d'or pouvaient être utilisées pour la détection de cellules cancéreuses. En effet, l'immobilisation sur les nanoparticules de biomolécules interagissant sélectivement avec des cellules cancéreuses permet d'obtenir des sondes dont la détection est basée sur la capacité des nanoparticules à réfléchir la lumière incidente émise par le microscope confocal. Les nanoparticules d'or peuvent être utilisées comme agent de contraste optique grâce aux propriétés optiques d'absorption et de réflexion associées aux plasmons de l'or. Une autre approche a été développée par Mirkin *et al.* dans J. Am. Chem. Soc. 125, 1643-1654, 2003 qui ont montré que l'hybridation de deux brins complémentaires d'oligonucléotide, portés par deux particules d'or distinctes, induisait un rapprochement de ces particules et donc un déplacement de la bande plasmon (résultant des oscillations collectives des électrons de la bande de conduction). Le changement de couleur du colloïde (du rouge au violet) peut alors être mis à profit pour la détection d'oligonucléotides en solution ou sur des biopuces à ADN.

Dubertret *et al.* dans Nature Biotechnology, 19, 365-370, 2001, se sont, quant à eux, appuyés sur l'extinction de fluorescence observée pour certains colorants organiques adsorbés sur l'or pour préparer des sondes à ADN. Ils ont montré que l'hybridation d'un brin d'oligonucléotide marqué par un fluorophore et immobilisé à la surface de l'or avec un brin libre permettait de restaurer la luminescence du fluorophore, grâce à l'éloignement de celui-ci de la surface d'or, générée par l'hybridation. L'émission d'une lumière de longueur d'onde caractéristique du fluorophore organique indique la présence de l'oligonucléotide libre. Cette technique par extinction de luminescence sert à détecter la présence d'oligonucléotide en solution.

L'enrobage du cœur métallique par une couche de type polysiloxane a également été réalisé dans WO 99/01 766. Cependant, le procédé mis en œuvre ne permet pas de maîtriser l'homogénéité de la couche de polysiloxane rendant plus difficile la maîtrise de la surface de la nanoparticule et donc le contrôle du nombre de molécules qui pourront y être greffées.

Toutes ces démarches de l'art antérieur sont restrictives, car elles ne peuvent s'appliquer que dans certaines conditions. La détection électrochimique ne permet pas de suivre le devenir d'une biomolécule *in vivo*. La technique de Mirkin *et al.* est limitée à la détection d'acides nucléiques. Par ailleurs, le déplacement de la bande plasmon peut être provoqué par d'autres facteurs (augmentation de la concentration en sel, température, vieillissement).

Dans ce contexte, l'un des problèmes que se propose de résoudre l'invention est de fournir de nouvelles sondes biologiques de taille nanométrique permettant la détection, le marquage et la quantification, *in vitro* et *in vivo*, dans des systèmes biologiques, avec sensibilité et reproductibilité.

Un autre problème, que se propose de résoudre l'invention, est de fournir de nouvelles sondes biologiques facilement détectables, de part leur émission de fluorescence ou de luminescence exacerbée après excitation.

L'invention vise également à fournir de nouvelles sondes biologiques polyfonctionnelles de taille et de composition contrôlées, produites selon un procédé simple, facilement industrialisable.

Pour atteindre ces objectifs, l'invention propose des nouvelles particules sondes hybrides comprenant une nanoparticule d'or de diamètre compris dans la gamme allant de 2 à 30 nm à la surface de laquelle sont greffées par des liaisons or-soufre d'une part, au moins une, et de préférence de 1 à 100, molécules organiques sondes et d'autre part, au moins 10, et de préférence 10 à 10000 molécules organiques à activité lumineuse.

L'invention propose également un nouveau type de sonde où la luminescence exacerbée est couplée à un cœur métallique nanométrique dense, permettant ainsi un autre système d'investigation comme la microscopie électronique à transmission et/ou basée sur les propriétés de réflexion, d'absorption et/ou de diffusion associées aux plasmons.

L'invention a également pour objet différents procédés de préparation des particules sondes hybrides telles que définies ci-dessus.

La description ci-après, en référence aux figures annexées, permet de mieux comprendre l'objet de l'invention.

La Fig. 1 met en évidence la persistance de la luminescence des dérivés de lissamine rhodamine B après greffage sur des nanoparticules d'or.

La Fig. 2 représente les spectres d'absorption d'une solution colloïdale de nanoparticules d'oxyde de gadolinium seules ou associées avec des nanoparticules d'or.

La Fig. 3 est une illustration schématique du principe de la biopuce utilisée.

La Fig. 4 montre l'influence de la dilution (Laser Argon,  $\lambda_{exc} = 480$  nm, P = 600  $\mu$ W) lors de l'immobilisation par hybridation sur une biopuce de nanoparticules d'or fonctionnalisées par 5 molécules à activité lumineuse (dérivé thiolé de la lissamine rhodamine B) et par un oligonucléotide.

La Fig. 5 représente la fluorescence observée après immobilisation sur des billes de Sépharose par hybridation de nanoparticules d'or comportant un oligonucléotide et un nombre variable de molécules à activité lumineuse (lissamine rhodamine B thiolée : rhoda-SH).

La Fig. 6 représente la quantification du signal de fluorescence observé sur la Fig. 5.

La Fig. 7 compare l'intensité lumineuse obtenue après marquage d'oligonucléotide par une seule molécule à activité luminescente (dérivé de la lissamine rhodamine B) et par une nanoparticule d'or comportant 100 molécules à activité luminescente (lissamine rhodamine B thiolée).

5 En préalable, les définitions de certains termes utilisés dans la présente demande de brevet sont données ci-après.

Les termes « molécule à activité luminescente », « fluorophore », « colorant », « molécule fluorescente » seront indifféremment utilisés pour désigner des entités qu'il est possible de détecter grâce à leur activité d'émission optique dans le visible et le proche infrarouge.

10 Par molécule « organique », on entend la définition classique bien connue de l'homme du métier, à savoir une molécule carbonée contenant éventuellement un ou plusieurs éléments choisis parmi : O, N, P, S et halogène. Les composés à base de silicium et/ou de métaux ne font, bien entendu, pas partie des molécules organiques.

15 Par molécule sonde, on entend un composé qui possède au moins un site de reconnaissance lui permettant de réagir avec une molécule cible d'intérêt biologique.

Le terme "polynucléotide" signifie un enchaînement d'au moins 2 désoxyribonucléotides ou ribonucléotides comprenant éventuellement au moins un nucléotide modifié, par exemple au moins un nucléotide comportant une base modifiée tel que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation. Ce polynucléotide peut aussi être modifié au niveau de la liaison internucléotidique, au niveau du squelette. Chacune de ces modifications peut être prise en combinaison. Le polynucléotide peut être un oligonucléotide, un acide nucléique naturel ou son fragment comme un ADN, un ARN ribosomique, un ARN messager, un ARN de transfert, un acide nucléique obtenu par une technique d'amplification enzymatique.

Par "polypeptide", on entend un enchaînement d'au moins deux acides aminés.

Le terme "protéine" inclut les holoprotéines et les hétéroprotéines comme les nucléoprotéines, les lipoprotéines, les phosphoprotéines, les métalloprotéines et les glycoprotéines aussi bien fibreuses que globulaires, les enzymes les récepteurs, les complexes enzyme/substrat, les glycoprotéines, les anticorps, les antigènes.

Le terme "anticorps" inclut les anticorps polyclonaux ou monoclonaux, les anticorps obtenus par recombinaison génétique et des fragments d'anticorps.

Le terme "antigène" désigne un composé susceptible d'être reconnu par un anticorps dont il a induit la synthèse par une réponse immune.

5 Par nanoparticule, on entend une particule de taille nanométrique. Ces nanoparticules peuvent être de n'importe quelle forme. Les particules de forme sphérique sont, néanmoins, préférées.

Le cœur des particules hybrides sondes selon l'invention est constitué par une nanoparticule d'or, préférentiellement de diamètre moyen compris dans la gamme  
10 allant de 2 à 30 nm, de préférence dans la gamme allant de 4 à 20 nm et préférentiellement dans la gamme allant de 5 à 16 nm. La taille moyenne étant déduite ici par spectroscopie de corrélation de photon (diffusion quasi-élastique de la lumière,  $\lambda = 633$  nm) et par analyse de clichés réalisés en microscopie électronique à transmission (MET). L'utilisation d'or est particulièrement avantageuse pour les  
15 raisons suivantes :

- l'or est compatible avec les organismes vivants et possède un seuil de tolérance assez élevé,
- l'or est un métal très difficilement oxydable, ce qui permet d'obtenir des nanoparticules présentant une grande stabilité (notamment la conservation de son état  
20 d'oxydation zéro et du comportement métallique),
  - la synthèse de nanoparticules d'or est aisée,
  - l'or est non-paramagnétique,
  - l'or présente une affinité particulière pour le soufre, ce qui rend possible le greffage de dérivés thiolés, la liaison or-soufre étant connue pour être  
25 particulièrement forte,
  - l'or est visible en imagerie MET,
  - l'or présente une absorption en plasmon de surface, ce qui permet d'obtenir des informations sur la nanoparticule, notamment sur sa taille.

Ces nanoparticules d'or sont polyfonctionnalisées par greffage de différents  
30 dérivés thiolés qui apportent :



- la reconnaissance biologique donnée par greffage d'au moins une, de préférence de une à 100 et préférentiellement de 1 à 10, molécules organiques sondes,

- la luminescence en milieu biologique donnée par greffage d'au moins 10, de préférence de 10 à 10000, préférentiellement 10 à 1000, molécules organiques à activité luminescente, avantageusement 100 à 500,

- la solubilité adaptée en fonction du milieu de travail,

- la redispersion,

- la non agrégation.

10 La fonctionnalisation est aisée, les différentes molécules greffées étant liées de façon quasi covalente à la nanoparticule d'or par des liaisons or-soufre. Dans le cadre de l'invention, les différentes molécules (molécules sondes, molécules à activité luminescente, ou autres molécules organiques) sont liées, soit directement à la nanoparticule par une liaison Au-S, soit par l'intermédiaire d'une molécule  
15 organique jouant le rôle d'espaceur, liée à la nanoparticule pour une liaison Au-S.

Si, actuellement, la nature de la liaison Au-S demeure indéterminée, il est néanmoins reconnu que les groupes thiolates sont fortement liés à la surface de l'or. D'après Dubois, et Nuzzo dans Ann. Phys. Chem. 43, 437-, 1992 et Ulman A. dans Chemical Reviews 96, 1533-1554, 1996, l'énergie de liaison est de 40 kcal.mol<sup>-1</sup>  
20 (contre 87kcal.mol<sup>-1</sup> pour la liaison S-H) et le bilan énergétique de l'adsorption d'un alcanethiolate sur l'or est négatif (~-5kcal.mol<sup>-1</sup>, réaction exothermique). L'interaction Au-S s'établissant après greffage de dérivés thiolés est si forte que ces derniers ne peuvent pas être expulsés de la surface par des lavages successifs. L'utilisation de dérivés thiolés apparaît donc particulièrement appropriée pour  
25 immobiliser des molécules de colorants et des biomolécules à la surface de nanoparticules d'or.

Un grand nombre de molécules organiques à activité luminescente est greffé en surface des nanoparticules d'or. De façon avantageuse, le nombre de molécules à activité luminescente greffées en surface de la nanoparticule d'or est au moins 10  
30 fois plus important que le nombre de molécules organiques sondes greffées.

De plus, au sens de l'invention, les molécules organiques à activité luminescente, également nommées colorants, sont fixées sur l'or soit directement

(dans ce cas les colorants sont thiolés) soit indirectement par l'intermédiaire d'un espaceur organique court (l'espaceur étant, de préférence, une molécule thiolée comportant entre 2 et 50 atomes de carbone). Les colorants ne sont donc pas liés à un oligonucléotide ou à un fragment d'ADN, comme décrit dans la demande internationale publiée sous le numéro WO 03/027678. Selon l'invention, les colorants sont liés de façon quasi covalente sur la nanoparticule d'or par liaison or – soufre. Par cette méthode, la fluorescence des colorants est préservée après greffage et n'est pas réduite par la présence de l'or qui absorbe fortement vers 520 nm, ce qui n'était pas le cas des composés précédemment choisis et adsorbés directement sur l'or. De plus, la fonction luminescente est assurée par un grand nombre de molécules organiques à activité luminescente greffées sur la nanoparticule d'or, conduisant à une émission forte en fluorescence après excitation, ce qui permet d'obtenir une luminescence finale globale par objet largement exaltée. Les nanoparticules hybrides selon l'invention deviennent alors visualisables à la fois en microscopie confocale en raison de l'absorption ou de la réflectivité (agent de contraste optique) et en microscopie électronique (agent de contraste électronique).

En effet, tout d'abord, la biomolécule cible est plus facilement repérée car, au lieu d'être marquée par un seul fluorophore, elle est "marquée" par plusieurs dizaines de molécules luminescentes. Une biopuce composée de billes de Sepharose porteuses d'oligonucléotide ( $d(A)_{22}$ ), immobilisée à la surface d'un élastomère (Fig. 3) est utilisée, pour mettre en évidence l'amplification obtenue grâce à l'utilisation de nanoparticules sondes hybrides selon l'invention porteuses de dérivés de lissamine rhodamine B et d'oligonucléotides. Les brins complémentaires à ceux immobilisés à la surface de la biopuce sont marqués, soit par une molécule unique de fluorophore (Lissamine rhodamine B) (Fig. 3A), soit par une nanoparticule hybride selon l'invention porteuse d'une multitude (2-200) de molécule de lissamine rhodamine B thiolée (Fig. 3B et Fig. 4). Les Fig. 5 et 6 mettent clairement en évidence l'augmentation de la fluorescence avec le nombre de molécules organiques fluorescentes (lissamine rhodamine B fonctionnalisée par une fonction thiol). Cependant, au delà de 400 molécules fluorescentes, l'intensité n'augmente plus et conserve la valeur mesurée pour des nanoparticules d'or sur lesquelles sont

immobilisées 400 molécules organiques fluorescentes. Ces résultats ont été obtenus sur des nanoparticules d'or de diamètre 12 nm.

Comme présenté sur la Fig. 3, suite à la réaction d'hybridation entre brins complémentaires, pour un même nombre de brins marqués ayant réagi avec les brins immobilisés, c'est à dire un même nombre de molécules cibles dans l'échantillon, une intensité de fluorescence supérieure est attendue. Ceci est illustré sur la Fig. 7 présentant la variation d'intensité de fluorescence obtenue en fonction de la quantité de brins présents dans l'échantillon, marqués soit par une molécule de lissamine rhodamine B, soit par une particule sonde hybride selon l'invention. Dans ce cas précis, plusieurs brins peuvent être présents à la surface de la nanoparticule, mais il est admis qu'un seul de ces brins aura la possibilité de réagir avec un brin immobilisé. La courbe présentée sur la Fig. 7, tient compte de ces paramètres et suppose qu'une centaine de brins est présente à la surface de la nanoparticule, un seul réagissant avec le brin immobilisé. Comme on peut l'observer, une augmentation du signal d'un facteur dix peut être obtenue entre les molécules marquées par un fluorophore (carré blanc) et celles marquées par une particule hybride sonde selon l'invention portant une centaine de fluorophores (carré noir). Malgré l'absorption partielle du signal lumineux émis par le colorant organique due au colloïde d'or, une augmentation d'intensité d'un facteur 10 est observée.

Selon une première variante avantageuse de l'invention, les colorants greffés émettent à une longueur d'onde située en dehors du maximum d'absorption du plasmon de l'or (à 540 nm).

De façon avantageuse, les molécules à activité lumineuse sont des colorants organiques fluorescents dont le maximum d'émission s'écarte d'au moins 25 nm du maximum d'absorption du plasmon de l'or. Des composés électroluminescents ou chimiluminescents, par exemple des dérivés du luminol pourront être utilisés. Des composés luminescents, dits à deux photons ou à émission anti-stokes, dont la longueur d'onde de la lumière émise est supérieure à la longueur d'onde d'excitation, de préférence d'au moins 200 nm pourront également être greffés. Les complexes de lanthanides, les dérivés de la rhodamine et plus particulièrement ceux de la lissamine rhodamine B sont des colorants particulièrement préférés.

Comme le montre la Fig. 1, le greffage de lissamine rhodamine B et de ses dérivés sur des nanoparticules d'or n'entraîne qu'une diminution d'un facteur 3 de l'intensité de luminescence obtenue, comparée à la même quantité de colorants libres (molécules individualisées). En augmentant le nombre de molécules de lissamine rhodamine B greffées, la luminescence par molécule biologique à détecter est encore augmentée.

Selon une autre variante avantageuse de réalisation de l'invention, les transferts non radiatifs entre les colorants organiques et l'or sont limités, de façon à obtenir des nanoparticules à extinction de luminescence réduite. Pour cela, on peut, par exemple, recouvrir au plus 75 % de la nanoparticule d'or d'un matériau de couverture présentant des caractéristiques diélectriques permettant le décalage de la bande plasmon de l'or en dehors de la zone d'émission des molécules à activité luminescente. Ce matériau de couverture est, par exemple, choisi parmi les polysiloxanes,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Ln}_2\text{O}_3$  et les oxohydroxydes de lanthanide. La couverture doit être partielle, de manière à laisser sur la nanoparticule d'or une surface libre suffisamment importante pour le greffage des molécules luminescentes et biologiques. En effet, le greffage des molécules organiques sondes et des molécules luminescentes se fait directement sur la particule d'or et nullement sur le matériau de couverture. La fig. 2 montre, à titre illustratif, comment le greffage par un oxyde de gadolinium permet d'éliminer l'absorption du plasmon de surface dans le domaine visible.

Une autre façon d'obtenir des nanoparticules à extinction de luminescence réduite est de greffer les molécules à activité luminescente par l'intermédiaire d'un espaceur organique thiolé. L'utilisation de colorants organiques préalablement greffés sur des « espaceurs rigides » (molécules thiolées organiques comportant par exemple un cycle benzénique) permet de maintenir le centre luminescent à une distance moyenne de la surface supérieure à 0,5 nm. Ces espaceurs contiennent, de préférence, au moins 6 carbones et moins de 50, et sont par exemple choisis parmi les mercaptophénols, l'acide dihydrolipoïque et les thio-poly(éthylèneglycol).

Par ailleurs, les nanoparticules sondes hybrides selon l'invention sont relativement photostables.

Les sondes selon l'invention sont parfaitement adaptées à une grande diversité de ciblage biologique, les spécificités étant dépendantes de la nature des molécules sondes greffées à la surface de la nanoparticule d'or. Les molécules sondes biologiques sont avantageusement choisies parmi les polynucléotides de type ADN, ARN ou oligonucléotides, les protéines de type anticorps, récepteur, enzyme, complexe enzyme/substrat, glycoprotéines, les polypeptides, les glycolipides, les oses, les polyosides et les vitamines. Les oligonucléotides thiolés ou liés à un espaceur thiolé sont particulièrement préférés. Les molécules organiques sondes peuvent également être tout type de molécules permettant l'interaction biotine-streptavidine.

Il est également possible de greffer sur la nanoparticule d'or d'autres molécules organiques thiolées, distinctes des molécules organiques sondes et des molécules à activité luminescente. Ces molécules organiques thiolées comportent, de préférence, au moins une fonction alcool, amine, sulfonate, acide carboxylique ou phosphate. On pourra choisir de greffer 1 à 1000, de préférence, 10 à 1000, de ces molécules organiques autres. Les fonctions apportées par ces autres molécules sont par exemple une meilleure stabilité, une solubilité adaptée en fonction du milieu de travail, une redispersion aisée, une non agrégation, une meilleure sélectivité.

L'invention combine donc astucieusement nanoparticules d'or, molécules sondes biologiques et molécules à activité luminescente, de manière à ce que la luminescence ne soit pas « détruite » par l'absorption de l'or, mais au contraire globalement augmentée par rapport à une molécule isolée (effet de nombre des composés greffés) et que les molécules sondes conservent leur efficacité vis-à-vis des cibles biologiques.

Les nanoparticules hybrides d'or selon l'invention sont facilement synthétisées par la méthode de Frens (voie citrate) dont il existe de nombreuses variantes (citrate/acide tannique) ou par celle de Brust appelée voie  $\text{NaBH}_4$ .

Pour la voie citrate, on pourra par exemple se référer à Nature Physical Science 241, 20-22, 1973. Dans ce cas, la réduction de tétrachloroaurate d'hydrogène par le citrate en phase aqueuse fournit des nanoparticules d'or recouvertes de citrate. Ce dernier joue un double rôle : il permet le contrôle de la croissance des nanoparticules et empêche la formation d'agrégats. L'association citrate/acide tannique fournit

également des nanoparticules recouvertes de citrate dont les dimensions sont plus petites. Le greffage de molécules thiolées sur les nanoparticules d'or procède par remplacement progressif des molécules de citrate grâce à une addition par portion de la solution de molécules thiolées. Cette étape est délicate car un remplacement trop brutal induit la précipitation des nanoparticules. L'immobilisation de différentes molécules thiolées s'effectue en autant d'étapes (une étape = ajout complet d'une solution d'espèces thiolées) qu'il y a de molécules différentes.

Pour la voie  $\text{NaBH}_4$ , on pourra notamment se référer à J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1655-1656, 1995. La voie  $\text{NaBH}_4$  consiste essentiellement à faire réagir, en milieu aqueux et en présence de borohydrure de sodium, du tétrachloroaurate d'hydrogène avec les dérivés thiolés que l'on souhaite greffer. Les dérivés thiolés greffés sont préparés selon des méthodes bien connues de l'homme de l'art. Par dérivés thiolés, on entend une molécule organique comportant au moins une fonction thiol-SH. Ces fonctions thiols peuvent être obtenues à partir de sulfures de dialkyl ou disulfures de dialkyle.

Ces différentes voies sont bien connues de l'homme du métier qui pourra y apporter de nombreuses variantes. A titre non limitatif, une description de différentes variantes avantageuses du procédé est donnée ci-après.

Selon une première variante, le procédé de préparation de particules sondes hybrides selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- préparer une suspension colloïdale de nanoparticules d'or de diamètre compris dans la gamme allant de 2 à 30 nm, par réduction d'un sel d'or, et en particulier de tétrachloroaurate d'hydrogène, en phase aqueuse ou alcoolique et en présence de citrate,
- ajouter, à la suspension colloïdale obtenue, une solution aqueuse ou alcoolique de molécules organiques sondes thiolées venant se greffer à la surface des nanoparticules d'or par liaison or-soufre en remplacement de molécules de citrate,
- ajouter, à la suspension colloïdale obtenue, une solution aqueuse ou alcoolique de molécules à activité luminescente venant se greffer à la surface des nanoparticules d'or par liaison or-soufre en remplacement de molécules de citrate.

Dans le cas des voies citrate et citrate / acide tannique, la préparation des particules sondes hybrides comporte au moins trois étapes. De façon avantageuse, la première consiste à préparer en phase aqueuse des particules d'or de dimension nanométrique comprise, généralement, entre 10 et 20 nm selon la voie citrate et entre 5 6 et 15 nm selon la voie citrate / acide tannique, et ce, avantageusement, par réduction de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  par le citrate (voie citrate) dans un rapport Au/Citrate compris entre 0,170 et 0,255 et par le couple citrate / acide tannique (voie citrate / acide tannique) dans des rapports Au/citrate et acide tannique/citrate compris entre 0,170 et 0,255 et entre 0,030 et 10, respectivement. Les nanoparticules d'or sont alors 10 recouvertes par des molécules de citrate adsorbées sur leur surface. Les colloïdes peuvent éventuellement être purifiés par dialyse contre l'eau.

Dans le cas des voies citrate et citrate / acide tannique, la fonctionnalisation des nanoparticules est réalisée en plusieurs étapes. Chaque étape correspond au greffage d'une seule sorte de molécules. Le greffage s'opère par remplacement du citrate 15 présent à la surface des nanoparticules et nécessite donc une addition lente de la solution contenant les molécules à greffer comportant une fonction thiol. La quantité de molécules greffées sur les nanoparticules d'or est avantageusement comprise entre 0,1 et 60 % des sites libres.

Le greffage de molécules à activité biologique, par exemple oligonucléotides 20 thiolées, acide folique modifié par une fonction thiol ou greffé sur du poly(éthylène glycol) (PEG) thiolé, est réalisé, de préférence, par addition de 1 à 500  $\mu\text{l}$  d'une solution aqueuse de concentration comprise entre 0,1  $\mu\text{M}$  et 40  $\mu\text{M}$ . La quantité de molécules sondes greffée à la surface des nanoparticules d'or est avantageusement comprise entre 1 et 200 molécules sondes par particule.

25 La deuxième étape consiste à greffer le colorant organique portant une ou plusieurs fonctions thiols par addition, de préférence, de 3 à 200  $\mu\text{l}$  d'une solution aqueuse (ou éthanolique) du colorant thiolé de concentration comprise entre 0,1 et 400  $\mu\text{M}$ . Le nombre de colorants thiolés greffés est avantageusement compris entre 10 et 400 par particules, pour des particules de diamètre 12 nm notamment.

30 On peut indifféremment effectuer le greffage des sondes biologiques avant ou après celui des colorants. Eventuellement peuvent être successivement ajoutées avant, entre ou après les deux étapes précédentes et dans un ordre indifférent les

solutions de différentes espèces thiolées comme le mercaptoéthanesulfonate de sodium, l'acide succinique, le PEG terminé par une fonction thiol. Lorsque la fonctionnalisation est complète, les nanoparticules d'or hybrides sont purifiées par chromatographie sur colonne (Sephadex™ G-25 M, éluant : solution tampon de pH  
5 compris entre 7 et 9).

Selon une autre variante de la voie citrate ou citrate/acide tannique, le procédé comprend les étapes suivantes :

- 10 - préparer une suspension colloïdale de nanoparticules d'or de diamètre compris dans la gamme allant de 2 à 30 nm, par réduction de tétrachloroaurate d'hydrogène, en phase aqueuse ou alcoolique et en présence de citrate,
- 15 - ajouter, à la suspension colloïdale obtenue, une solution aqueuse ou alcoolique d'espaces thiolés fonctionnalisés avec une fonction ionisable susceptible de réagir avec les molécules organiques sondes ou les molécules à activité luminescente à greffer, les dits espaces venant se greffer à la surface des nanoparticules d'or par liaison or-soufre en remplacement de molécules de citrate,
- 20 - ajouter une solution aqueuse ou alcoolique de molécules organiques sondes fonctionnalisées pour réagir avec la fonction ionisable portée par les espaces greffés en surface de la nanoparticule d'or,
- et/ou ajouter une solution aqueuse ou alcoolique de molécules organiques sondes fonctionnalisées pour réagir avec la fonction ionisable portée par les espaces greffés en surface de la nanoparticule d'or.

Au lieu de greffer directement une molécule organique thiolée à activité  
25 luminescente ou biologique à la surface d'une nanoparticule d'or, cette autre variante consiste à réaliser le greffage par condensation entre deux fonctions réactives complémentaires présentes pour l'une dans la molécule active à greffer (colorant, sonde ...) et pour l'autre à l'extrémité d'une molécule thiolée immobilisée à la surface de l'or et jouant le rôle d'espaceur. Le greffage d'une molécule organique à activité  
30 luminescente ou biologique nécessite la présence d'une fonction thiol pour lui assurer une immobilisation durable sur la particule d'or. La plupart de ces molécules en sont dépourvues. La fonction thiol peut être introduite par synthèse organique avant



greffage (cas du protocole citrate). Une autre façon de procéder consiste à greffer la molécule active dépourvue de fonction thiol sur un espaceur thiolé présente à la surface de la nanoparticule d'or. Par rapport au protocole précédent l'étape de greffage de molécules actives thiolées est remplacée par deux étapes. La première  
5 consiste à immobiliser l'espaceur thiolé servant de point d'ancrage (bras espaceur) à la molécule à activité luminescente ou biologique. Avantageusement, de 1 à 500  $\mu$ l d'une solution aqueuse de l'espaceur de concentration comprise entre 0,1 et 400  $\mu$ M est alors ajoutée au colloïde de nanoparticules d'or. Le nombre de molécules thiolées immobilisées est avantageusement compris entre 0,1% et 50 % de sites libres.

10 Ensuite, une solution aqueuse de la molécule active à greffer est ajoutée lentement. Cette solution peut éventuellement contenir un réactif facilitant le couplage. L'élimination des produits secondaires est réalisée par dialyse de la solution colloïdale contre l'eau. L'espaceur utilisé comme site de greffage doit nécessairement comporter une fonction thiol (indispensable pour l'immobilisation sur  
15 l'or) et au moins une fonction réactive (-OH, -NH<sub>2</sub>, -COCl...) pour assurer le greffage ultérieur de la molécule active. Afin d'obtenir les meilleurs résultats en luminescence, la chaîne carbonée entre la fonction thiol et la fonction réactive doit être rigide et comporte de préférence de 6 à 50 atomes de carbone. La molécule organique à activité luminescente ou biologique doit nécessairement comporter une fonction  
20 réactive (-SO<sub>2</sub>Cl, -COCl, -OH, -NH<sub>2</sub>) capable de réagir avec celle portée par le bras espaceur immobilisé à la surface des nanoparticules d'or. On pourra notamment se référer à Chem. Eur. J, 8, 16, 3808-3814, 2002 et Chem. Commun. 1913-1914, 2000.

Quel que soit le protocole utilisé (molécule active thiolée ou espaceur thiolé), le nombre de molécules à activité luminescente immobilisées à la surface des  
25 nanoparticules est déterminé par spectroscopie UV-visible de la solution après précipitation des nanoparticules. La différence entre le nombre de molécules ajoutées au colloïde et le nombre de molécules présentes dans le surnageant (après filtration du précipité) indique le nombre de molécules immobilisées à la surface des nanoparticules d'or.

30 Selon une autre variante mettant en œuvre la voie NaBH<sub>4</sub>, le procédé comprend les étapes suivantes :

- préparer une suspension colloïdale de nanoparticules d'or de diamètre compris dans la gamme allant de 2 à 30 nm, par réduction de sel d'or, et en particulier de tétrachloroaurate d'hydrogène, en phase aqueuse ou alcoolique et en présence de  $\text{NaBH}_4$ ,
- 5        - ajouter, à la suspension colloïdale obtenue, une solution aqueuse ou alcoolique d'espaceurs thiolés fonctionnalisés avec une fonction ionisable susceptible de réagir avec les molécules organiques sondes ou les molécules à activité luminescente à greffer, les dits espaceurs venant se greffer à la surface des nanoparticules d'or par liaison or-soufre,
- 10       - ajouter une solution aqueuse ou alcoolique de molécules organiques sondes fonctionnalisées pour réagir avec la fonction ionisable portée par les espaceurs greffés en surface de la nanoparticule d'or,
- ajouter une solution aqueuse ou alcoolique de molécules organiques sondes fonctionnalisées pour réagir avec la fonction ionisable portée par les
- 15       espaceurs greffés en surface de la nanoparticule d'or.

Dans le cas de la voie  $\text{NaBH}_4$ , les molécules thiolées présentes à la surface des nanoparticules d'or ont en général été introduites lors de la synthèse. Certaines peuvent être substituées mais avec un contrôle incertain du nombre de molécules remplacées. L'immobilisation de molécules à activité biologique et de colorants

20       organiques s'effectuera dans la plupart des cas (pour une meilleure efficacité) par greffage sur des espaceurs thiolés présents à la surface des nanoparticules d'or. La synthèse par la voie  $\text{NaBH}_4$  de nanoparticules hybrides pour le marquage biologique nécessite également plusieurs étapes. La première consiste à préparer dans un alcool, de préférence, le méthanol, l'éthanol ou le diméthylformamide, les nanoparticules

25       d'or recouvertes de molécules thiolées possédant une fonction ionisable en une seule étape par réduction de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  par une solution aqueuse de  $\text{NaBH}_4$  ( $\text{Au}/\text{NaBH}_4$  compris, par exemple, entre 0,05 et 0,5) en présence des molécules organiques thiolées possédant une fonction ionisable dont le rapport  $\text{Au}/\text{S}$  est, avantageusement, compris entre 0,2 et 10. Par cette méthode, la couverture des

30       nanoparticules d'or est quasi totale.

Comme le remplacement des molécules thiolées à la surface des nanoparticules d'or est difficile et comme la surface est complètement recouverte, le choix des

molécules thiolées est déterminant. Ces molécules doivent permettre à la fois une excellente redispersion des nanoparticules dans une solution aqueuse afin d'obtenir un colloïde stable et le greffage de molécules sondes et de colorants organiques. Des espaceurs thiolées possédant également une fonction ionisable ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ )  
5 apparaissent appropriées pour préparer des nanoparticules hybrides d'or redispersables et stables (sous certaines conditions de pH) en solution aqueuse. De plus, ces fonctions ionisables peuvent servir à immobiliser des molécules sondes et des colorants organiques par de simples réactions de condensation (formation d'ester, d'amide, de dérivés de l'urée ou de la thiourée...).

10 Après réduction et donc formation des nanoparticules d'or, un précipité apparaît. Au maximum 2/3 du solvant (méthanol ou éthanol) sont alors évaporés sous pression réduite à une température inférieure à  $40^\circ\text{C}$ . Le précipité est filtré sur membrane polymère (avec, par exemple, un diamètre de pores égal à  $0,22\ \mu\text{m}$ ) et lavé méticuleusement avec différents solvants (choisis selon la nature du thiol  
15 immobilisé à la surface). Ce lavage vise à éliminer les co-produits de la réduction et la grande quantité de thiols non adsorbés.

La poudre obtenue est, après séchage à l'air, redispersée en phase aqueuse dans une gamme de pH contrôlée (qui dépend de la nature du groupement ionisable présent dans la molécule thiolée). Le colorant organique est ensuite greffé sur la  
20 nanoparticule par réaction entre une fonction réactive, du type  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_2\text{Cl}$ ,  $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$  notamment, présente sur le colorant et la fonction ionisable de l'espaceur thiolé greffé sur les nanoparticules d'or. Cette réaction est réalisée en additionnant à la solution colloïdale une solution aqueuse ou aquo-alcoolique de colorant organique dont la quantité est au moins quatre fois supérieure  
25 au nombre de molécules thiolées adsorbées sur les nanoparticules d'or. Entre 0,5 et 10 % des fonctions ionisables des molécules thiolées adsorbées sur l'or réagissent en général. Les produits secondaires en excès sont alors éliminés par précipitation des nanoparticules obtenue par une forte variation du pH ( $\Delta\text{pH} \geq 2$ ). Le précipité est filtré sur membrane (diamètre des pores égal à  $0,22\ \mu\text{m}$  par exemple) et lavé  
30 méticuleusement avant d'être redispersé en solution aqueuse dans une gamme de pH contrôlée.

Les molécules sondes sont greffées sur une partie des 85 à 90 % des fonctions ionisables restantes après le greffage du colorant organique. Le couplage est effectué par addition d'une solution aqueuse de molécules sondes dont la quantité est au moins supérieure au nombre de molécules thiolées adsorbées sur les nanoparticules d'or. Entre 0,1 et 2 % des fonctions ionisables des molécules thiolées greffées sur l'or réagissent. Afin d'éviter la dénaturation par la répétition des étapes de séparation, lavage et redispersion, le greffage des molécules sondes est, avantageusement, réalisé après celui des colorants organiques. Les produits secondaires en excès sont éliminés comme précédemment.

10 La caractérisation des nanoparticules est réalisée à l'état solide par XPS, XANES, ATG et à l'état liquide par spectroscopie UV-visible et XANES.

Une autre variante du procédé consiste à immobiliser les molécules sondes par échange de molécules sondes thiolées avec d'autres molécules thiolées déjà greffées à la surface des nanoparticules d'or. Afin d'éviter l'échange préjudiciable avec une partie des molécules thiolées couplées à des colorants, il est indispensable dans ce cas de réaliser l'immobilisation des molécules à activité biologique avant celle des colorants organiques. Cependant, ces réactions d'échange sont relativement aléatoires et difficiles à maîtriser.

Il faut noter que dans la voie  $\text{NaBH}_4$ , la couverture des nanoparticules d'or par les molécules thiolées est quasiment complète. L'introduction de nouvelles molécules thiolées s'effectue par conséquent uniquement par échange.

Il est important de noter que pour les nanoparticules sondes hybrides préparées en présence de citrate, il n'y a pas d'échange significatif de thiols : les nanohybrides sont donc stables dans ces cas et les propriétés conservées. La voie proposée permet donc de déterminer le « revêtement » de la nanoparticule d'or, et donc les caractéristiques de la particule sonde obtenue.

Selon l'invention, il est possible de greffer, à la surface des nanoparticules d'or, des quantités variables mais déterminées de molécules fluorescentes et de sondes biologiques. Le nombre de molécules à la surface des nanoparticules peut être aisément déterminé par spectroscopie UV après précipitation des particules d'or, permettant ainsi de connaître la composition chimique de la surface.

Les nouvelles particules sondes selon l'invention présentent un intérêt tout particulier, notamment, dans l'amélioration des biopuces, l'étude de l'interaction entre des microorganismes et leur environnement, la traque individuelle de biomolécules pour l'étude du trafic cellulaire et de l'activité cellulaire.

- 5 Les exemples ci-après sont donnés à titre purement illustratif et n'ont pas de caractère limitatif.

### Exemple 1

#### 10 Préparation d'une suspension colloïdale de nanoparticules d'or par la méthode citrate / acide tannique.

40 mg de citrate de sodium et 10 mg d'acide tannique sont dissous dans 20 ml d'eau ultra pure. Parallèlement, 10 mg de tétrachloroaurate d'hydrogène, trihydrate  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  sont dissous dans 80 ml d'eau ultra pure. Les deux solutions sont ensuite chauffées à 60°C puis réunies par transvasement de la solution citrate de sodium/acide tannique dans la solution d'or. Le mélange est alors chauffé à 60°C à  
15 reflux pendant 1 heure puis porté à ébullition pendant 10 minutes et enfin refroidi à température ambiante en maintenant l'agitation. Les nanoparticules obtenues ont un diamètre moyen de 8 nm, ce qui renvoie à une concentration de  $1,67 \cdot 10^{-8}$  moles de nanoparticules /litre.

20

### Exemple 2

#### Préparation de nanoparticules d'or stabilisées et prêtes à être fonctionnalisées par greffage de dérivés thiolés.

La surface des nanoparticules synthétisées selon l'exemple 1 est recouverte par des dérivés thiolés dans des proportions précises. Les dérivés thiolés utilisés sont le  
25 mercaptoéthanesulfonate de sodium (MES), l'acide thiomaléique (AT) et le mercaptophénol (MP). A une solution de 60 ml de nanoparticules sont ajoutés 2 ml de solutions aqueuses de chaque dérivé thiolé dont les concentrations sont les suivantes :

- 30 AT :  $1,112 \cdot 10^{-7}$  M obtenu par dissolution de 16,69 mg dans 100 ml d'eau deionisée,  
MES :  $1,112 \cdot 10^{-7}$  M obtenu par dissolution de 18,26 mg dans 100 ml d'eau deionisée,  
MP :  $2,224 \cdot 10^{-7}$  M obtenu par dissolution de 28,50 mg dans 100 ml d'eau deionisée.

Les ajouts sont faits successivement toutes les 30 minutes, la solution est maintenue sous agitation constante.

### Exemple 3

- 5 **Préparation d'une suspension colloïdale de nanoparticules d'or luminescentes par la méthode citrate / acide tannique dans les mêmes conditions que celles de l'exemple 2.**

Sur les fonctions hydroxyles des mercaptophénols greffés à la surface des nanoparticules d'or sont immobilisées des molécules fluorescentes de rhodamine  
10 lissamine B. Sur 30 ml de solution préparée selon l'exemple 2 est ajouté 1 ml d'une solution aqueuse de sulfochlorure de lissamine rhodamine B de concentration  $10^{-7}$  M en présence de 10 ml de triéthylamine concentrée. On obtient ainsi des nanoparticules d'or portant en moyenne 200 molécules de lissamine rhodamine B.

15 **Exemple 4**

**Synthèse d'un dérivé thiolé de la rhodamine lissamine B.**

Ce dérivé est obtenu par réaction de la fonction amine de l'aminothiophénol sur la fonction sulfochlorure de la rhodamine lissamine B. La réaction se déroule à température ambiante par dissolution dans 100 ml de chloroforme de 125 mg de  
20 sulfochlorure lissamine rhodamine B et 26,9 mg d'aminothiophénol en présence d'1 ml de triéthylamine. La solution est agitée durant un jour puis purifiée par colonne chromatographique de silice avec un éluant dichlorométhane/méthanol, 9 / 1 (v/v).

### Exemple 5

- 25 **Greffage de dérivés thiolés de la lissamine rhodamine B préparés selon l'exemple 4 sur la surface de nanoparticules d'or préparées selon l'exemple 1.**

La préparation est réalisée par ajout de solutions de lissamine rhodamine B thiolée à la solution de nanoparticules d'or sous agitation mécanique. Cet ajout est de quantité et de concentration variables selon le nombre de molécules fluorescentes désirées par  
30 nanoparticule ; ce nombre peut varier de 1 à 400 pour des nanoparticules de 12 nm de diamètre.

Pour exemple, pour un rapport désiré de 100 molécules de lissamine rhodamine B par nanoparticule, l'ajout sera de 1 ml d'une solution aqueuse à  $1,67.10^{-5}$  M de lissamine rhodamine B thiolée sur 10 ml d'une solution à  $1,67.10^{-8}$  M de nanoparticules d'or.

5

#### **Exemple 6**

##### **Greffage d'un dérivé de l'acide folique à terminaison soufrée.**

Un dérivé soufré de l'acide folique est obtenu par greffage d'un *bis*-aminopropylpolyéthylèneglycol puis modification par le réactif de Traut afin d'obtenir une fonction thiol. Ce dérivé est greffé à la surface de nanoparticules d'or par ajout à une solution de nanoparticules préparée selon l'exemple 1.

10

#### **Exemple 7**

##### **Greffage d'oligonucléotides sur les nanoparticules d'or**

Les oligonucléotides d(T)<sub>22</sub> terminés par une fonction thiol utilisés sont préalablement filtrés sur colonne, 69 nanomoles d'oligonucléotides diluées dans 2,33 ml d'eau, soit une concentration de  $29,6.10^{-6}$  M, sont récupérées. De 3,35 µl à 335,1 µl (de 0,2 à 20 oligonucléotides par nanoparticule) de cette solution sont ensuite ajoutés à 1 ml de nanoparticules d'or préparées selon l'exemple 1, 3 ou 5.

15

20

#### **Exemple 8**

##### **Greffage de dérivés thiolés de la lissamine rhodamine B préparés selon l'exemple 4 sur la surface de nanoparticules d'or préparées selon l'exemple 7.**

Sur les nanoparticules préparées selon l'exemple 7, on greffe des dérivés de lissamine rhodamine B thiolés préparés selon l'exemple 4 dans un rapport 100 pour une nanoparticule d'or. Ce greffage se fait comme décrit précédemment dans l'exemple 5.

25

**Exemple 9**

**Synthèse de particules d'or partiellement entourées de particules d'oxyde de gadolinium pour décalage de l'absorption en dehors de la zone d'émission des molécules à activité lumineuse greffées.**

Le colloïde de nanoparticules de  $Gd_2O_3$  5%  $Tb^{3+}$  a été préparé selon la méthode polyol (R. Bazzi, M.A. Flores-Gonzalez, C. Louis, K. Lebbou, C. Dujardin, A. Brenier, W. Zhang, O. Tillement, E. Bernstein and P. Perriat dans Journal of Luminescence 102-103, 445-450, 2003). Elle consiste à précipiter directement des nanoparticules d'oxydes luminescents à partir de sels métalliques dissous dans du diéthylène glycol. Après synthèse, le colloïde obtenu est dialysé à 40°C dans du diéthylène glycol (1:20 en volume).

Ensuite,  $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$  est dissous dans le colloïde (1:3 en masse de sels initiaux). La solution est agitée pendant 15 minutes, pour devenir jaune. Deux solutions aqueuses contenant pour la première 1 g.l<sup>-1</sup> de citrate de sodium et 1,5 g.l<sup>-1</sup> d'acide tannique et pour la seconde 0,5 g.l<sup>-1</sup> de  $NaBH_4$  sont préparées afin de réduire le sel d'or.

La première solution est ajoutée au colloïde, sous agitation. Au bout de cinq minutes, la deuxième solution est ajoutée (1 : 1 : 1 en volume). L'ajout se fait lentement au goutte à goutte. Le colloïde, au cours des différents ajouts, perd sa couleur jaune pour passer par une phase transparente, puis par une phase rouge intense, qui apparaît progressivement, preuve directe de la présence de nanoparticules d'or. Sous certaines conditions, la luminescence peut être grandement exacerbée (d'au moins un facteur 10).

25

**Exemple 10**

**Synthèse de nanoparticules d'or stabilisées par des molécules thiolées portant à leur extrémité une fonction acide carboxylique.**

A 60 ml de méthanol contenant  $49 \cdot 10^{-5}$  mol d'acide tétrachloroaurique ( $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ ) sont ajoutés 38 ml de méthanol contenant de 49 à  $196 \cdot 10^{-5}$  mol d'acide carboxylique portant une ou deux fonctions thiols et 1,96 ml d'acide éthanoïque. Après 5 minutes d'agitation, 13,2 ml d'une solution aqueuse contenant  $480 \cdot 10^{-5}$  mol

30



de tétrahydruroborate de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) sont ajoutés goutte à goutte au mélange qui noircit.

Après 1 heure d'agitation, 4 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique ( $\text{HCl}$ , 1 N) sont ajoutés au mélange réactionnel. La suspension noire obtenue est concentrée par évaporation partielle du méthanol sous pression réduite. Le solide noir est filtré, lavé par 3x30 ml d' $\text{HCl}$  0,1 N, 2x20 ml d'eau et 3x30 ml d'éther de diéthyle. Le mélange réactionnel est ensuite séché à la température ambiante. La poudre obtenue peut être aisément redispersée dans une solution aqueuse dont le pH est supérieur ou égal à 7.

10

### Exemple 11

**Greffage de luminol sur les nanoparticules d'or préparées selon l'exemple 10.**

8 mg de nanoparticules d'or (de diamètre moyen égal à 5 nm) sont dispersées dans 10 ml d'une solution aqueuse de pH 8-10. 1 ml d'une solution de 0,1 M de 1-éthyl-3-(3-diméthylamino)propyl carbodiimide (EDC) et 0,2 M de pentafluorophénol dans le propan-2-ol est ajouté à la solution colloïdale de nanoparticules d'or. Après 90 minutes, 154  $\mu\text{l}$  à 1,54 ml d'une solution aqueuse à  $10^{-2}$  M de luminol sont ajoutés. Après 150 minutes, les nanoparticules sont précipitées par ajout d'une solution aqueuse de  $\text{HCl}$  1 N. Le précipité résultant est filtré et lavé avant d'être redispersé dans une solution aqueuse de pH  $\geq 7$ .

20

*Variante :* au lieu d'une solution de propan-2-ol contenant 0,1 M de d'EDC et 0,2 M de pentafluorophénol, une solution aqueuse de 0,1 M d'EDC et 0,2 M de *N*-hydroxysuccinimide peut être utilisée.

### 25 Exemple 12

**Greffage d'un oligonucléotide thiolé sur les nanoparticules préparées selon l'exemple 11.**

A 1 ml d'une solution colloïdale de nanoparticules d'or ( $6,7 \cdot 10^{17}$  nanoparticules/litre) sont ajoutées  $1,11 \cdot 10^{-9}$  mol d'oligonucléotides thiolés. Après 1 h, les particules sont précipitées par ajout de nanoparticules de  $\text{HCl}$  1 N. Le précipité résultant est filtré et lavé avant d'être redispersé dans une solution aqueuse de pH  $\geq 7$ .

30

**Exemple 13**

**Greffage d'un oligonucléotide terminé par une fonction amine sur les nanoparticules préparées selon l'exemple 11.**

- A 1 ml d'une solution colloïdale de nanoparticules d'or ( $6,7.10^{17}$  nanoparticules/litre) est ajouté 1 ml d'une solution à 0,1 M d'EDC et 0,2 M de pentafluorophénol dans le propan-2-ol. Après 90 minutes,  $1,11.10^{-9}$  mol d'oligonucléotides thiolés d(T)<sub>22</sub> terminés par une fonction amine sont ajoutés. Après 2 heures et 30 minutes, les nanoparticules sont précipitées par ajout d'une solution aqueuse de HCl 1 N. Le précipité résultant est filtré et lavé avant d'être redispersé dans une solution aqueuse de pH 8-10.

*Variante* : au lieu d'une solution de propan-2-ol contenant 0,1 M d'EDC et 0,2 M de pentafluorophénol, une solution aqueuse de 0,1 M d'EDC et 0,2 M de *N*-hydroxysuccinimide peut être utilisée.

## REVENDEICATIONS

1 - Particules sondes hybrides comprenant une nanoparticule d'or de diamètre compris dans la gamme allant de 2 à 30 nm à la surface de laquelle sont greffées par des liaisons or-soufre, d'une part, au moins une, et de préférence de une à 100, 5 molécules organiques sondes et d'autre part, au moins 10, et de préférence 10 à 10000, molécules à activité lumineuse.

2 - Particules sondes hybrides selon la revendication 1 caractérisées en ce que le nombre de molécules à activité lumineuse greffées en surface de la nanoparticule d'or est au moins 10 fois plus important que le nombre de molécules organiques 10 sondes greffées.

3 - Particules sondes hybrides selon la revendication 1 ou 2 caractérisées en ce que 10 à 1000, de préférence 100 à 500, molécules à activité lumineuse sont greffées sur la nanoparticule d'or.

4 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisées 15 en ce que les molécules à activité lumineuse sont des colorants organiques fluorescents dont le maximum d'émission s'écarte d'au moins 25 nm du maximum d'absorption du plasmon de l'or.

5 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisées en ce que les molécules à activité lumineuse sont des composés 20 électroluminescents ou chimiluminescents, par exemple des dérivés du luminol.

6 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisées en ce que les molécules à activité lumineuse sont des composés luminescents dont la longueur d'onde de la lumière émise est supérieure à la longueur d'onde d'excitation, de préférence d'au moins 200 nm.

25 7 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisées en ce que les molécules à activité lumineuse sont des complexes de lanthanides.

8 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisées en ce que les molécules à activité lumineuse sont choisies parmi les dérivés de la rhodamine et en particulier ceux de la lissamine rhodamine B.

30 9 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisées en ce qu'au plus 75 % de la nanoparticule d'or est recouverte d'un matériau de couverture présentant des caractéristiques diélectriques permettant le décalage de la

bande plasmon de l'or en dehors de la zone d'émission des molécules à activité luminescente.

10 - Particules sondes hybrides selon la revendication 9 caractérisées en ce que le matériau de couverture est choisi parmi les polysiloxanes,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Ln}_2\text{O}_3$  et les oxohydroxydes de lanthanide.

11 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisées en ce que les molécules à activité luminescente sont greffées à la nanoparticules d'or par l'intermédiaire d'un espaceur organique thiolé, cet espaceur n'étant pas identique aux molécules organiques sondes.

12 - Particules sondes hybrides selon la revendication 11 caractérisées en ce que l'espaceur contient de 6 à 50 atomes de carbone et est, par exemple, choisi parmi les mercaptophénols, l'acide dihydrolipoïque et les thio-poly(éthylèneglycol).

13 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 12 caractérisées en ce que la nanoparticule d'or présente un diamètre compris dans la gamme allant de 4 à 20 nm, de préférence dans la gamme allant de 5 à 16 nm.

14 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisées en ce que 1 à 10 molécules organiques sondes sont greffées sur la nanoparticule d'or.

15 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 14 caractérisées en ce que les molécules organiques sondes sont choisies parmi les polynucléotides de type ADN, ARN ou oligonucléotides, les protéines de type anticorps, récepteur, enzyme, complexe enzyme/substrat, glycoprotéines, les polypeptides, les glycolipides, les oses, les polyosides et les vitamines.

16 - Particules sondes hybrides selon la revendication 14 caractérisées en ce que les molécules organiques sondes sont des oligonucléotides thiolés ou liés à un espaceur thiolé.

17 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 14 caractérisées en ce que les molécules organiques sondes sont des molécules permettant l'interaction biotine - streptavidine.

18 - Particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 17 caractérisées en ce qu' en outre, 10 à 1000 molécules organiques thiolées autres, distinctes des molécules organiques sondes et des molécules à activité luminescente, sont greffées sur la nanoparticule d'or, ces molécules organiques thiolées autres comportant, de

préférence, au moins une fonction alcool, amine, sulfonate, acide carboxylique ou phosphate.

**19** - Procédé de préparation de particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 18 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5       - préparer une suspension colloïdale de nanoparticules d'or de diamètre compris dans la gamme allant de 2 à 30 nm, par réduction d'un sel d'or, et en particulier de tétrachloroaurate d'hydrogène, en phase aqueuse ou alcoolique et en présence de citrate,
- 10       - ajouter, à la suspension colloïdale obtenue, une solution aqueuse ou alcoolique de molécules organiques sondes thiolées venant se greffer à la surface des nanoparticules d'or par liaison or-soufre en remplacement de molécules de citrate,
- 15       - ajouter, à la suspension colloïdale obtenue, une solution aqueuse ou alcoolique de molécules à activité luminescente venant se greffer à la surface des nanoparticules d'or par liaison or-soufre en remplacement de molécules de citrate.

**20** - Procédé de préparation de particules sondes hybrides caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 20       - préparer une suspension colloïdale de nanoparticules d'or de diamètre compris dans la gamme allant de 2 à 30 nm, par réduction de tétrachloroaurate d'hydrogène, en phase aqueuse ou alcoolique et en présence de citrate,
- 25       - ajouter, à la suspension colloïdale obtenue, une solution aqueuse ou alcoolique d'espaceurs thiolés fonctionnalisés avec une fonction ionisable susceptible de réagir avec les molécules organiques sondes ou les molécules à activité luminescente à greffer, les dits espaceurs venant se greffer à la surface des nanoparticules d'or par liaison or-soufre en remplacement de molécules de citrate,
- 30       - ajouter une solution aqueuse ou alcoolique de molécules organiques sondes fonctionnalisées pour réagir avec la fonction ionisable portée par les espaceurs greffés en surface de la nanoparticule d'or,

- et/ou ajouter une solution aqueuse ou alcoolique de molécules organiques sondes fonctionnalisées pour réagir avec la fonction ionisable portée par les espaceurs greffés en surface de la nanoparticule d'or.

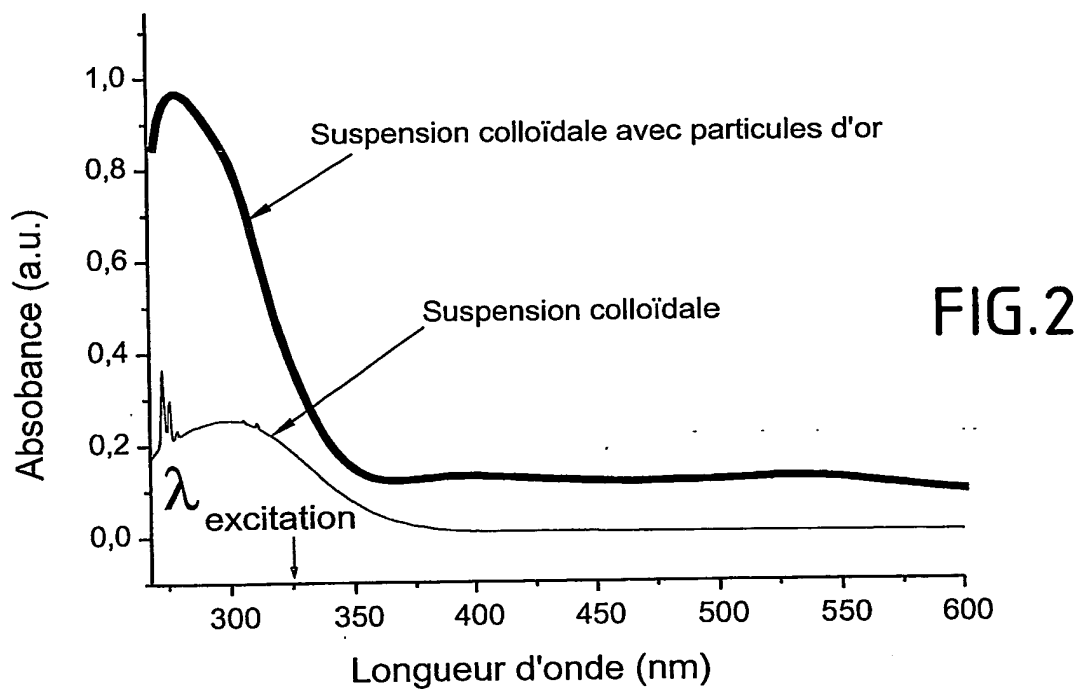
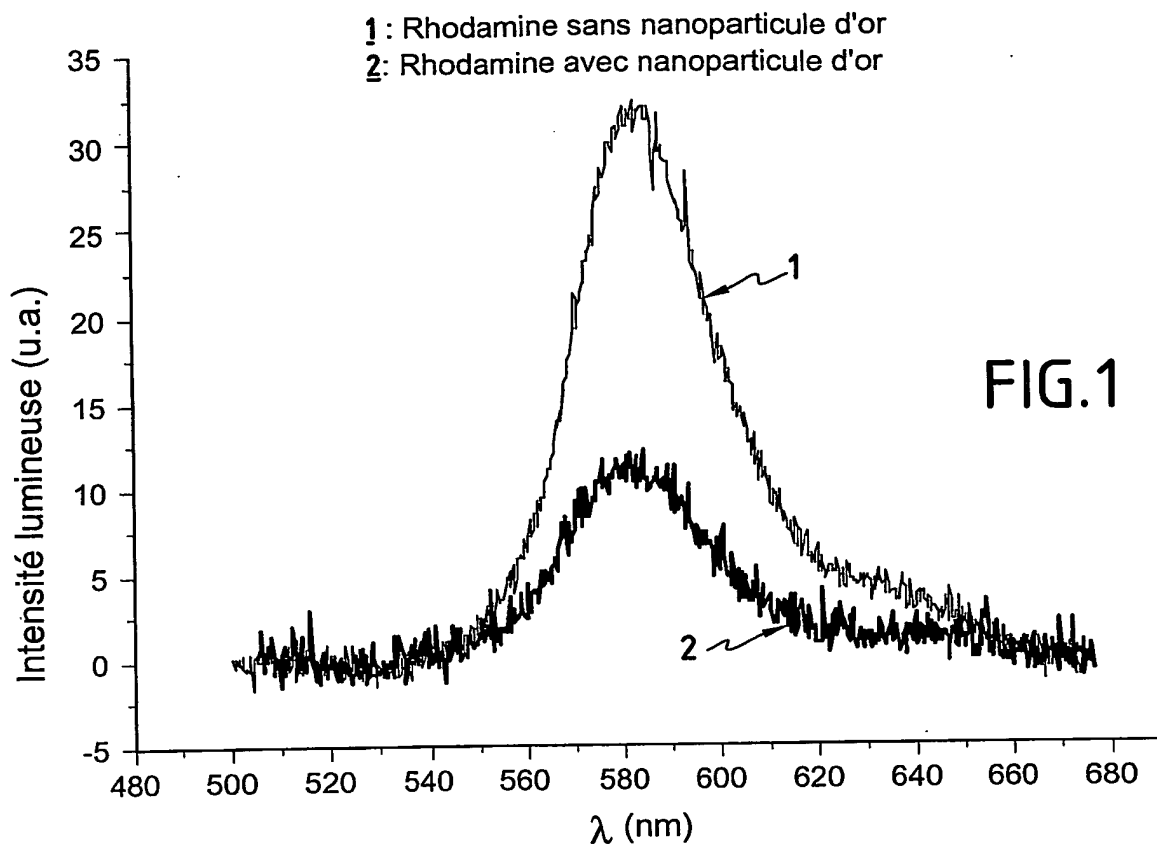
21 - Procédé de préparation de particules sondes hybrides selon la revendication 5 19 ou 20 caractérisé en ce que la réduction du sel d'or est réalisée en présence d'acide tannique.

22 - Procédé de préparation de particules sondes hybrides selon l'une des revendications 1 à 18 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 10 - préparer une suspension colloïdale de nanoparticules d'or de diamètre compris dans la gamme allant de 2 à 30 nm, par réduction de sel d'or, et en particulier de tétrachloroaurate d'hydrogène, en phase aqueuse ou alcoolique et en présence de  $\text{NaBH}_4$ ,
- 15 - ajouter, à la suspension colloïdale obtenue, une solution aqueuse ou alcoolique d'espaceurs thiolés fonctionnalisés avec une fonction ionisable susceptible de réagir avec les molécules organiques sondes ou les molécules à activité luminescente à greffer, les dits espaceurs venant se greffer à la surface des nanoparticules d'or par liaison or-soufre,
- 20 - ajouter une solution aqueuse ou alcoolique de molécules organiques sondes fonctionnalisées pour réagir avec la fonction ionisable portée par les espaceurs greffés en surface de la nanoparticule d'or,
- ajouter une solution aqueuse ou alcoolique de molécules organiques sondes fonctionnalisées pour réagir avec la fonction ionisable portée par les espaceurs greffés en surface de la nanoparticule d'or.

25

1/4



2/4

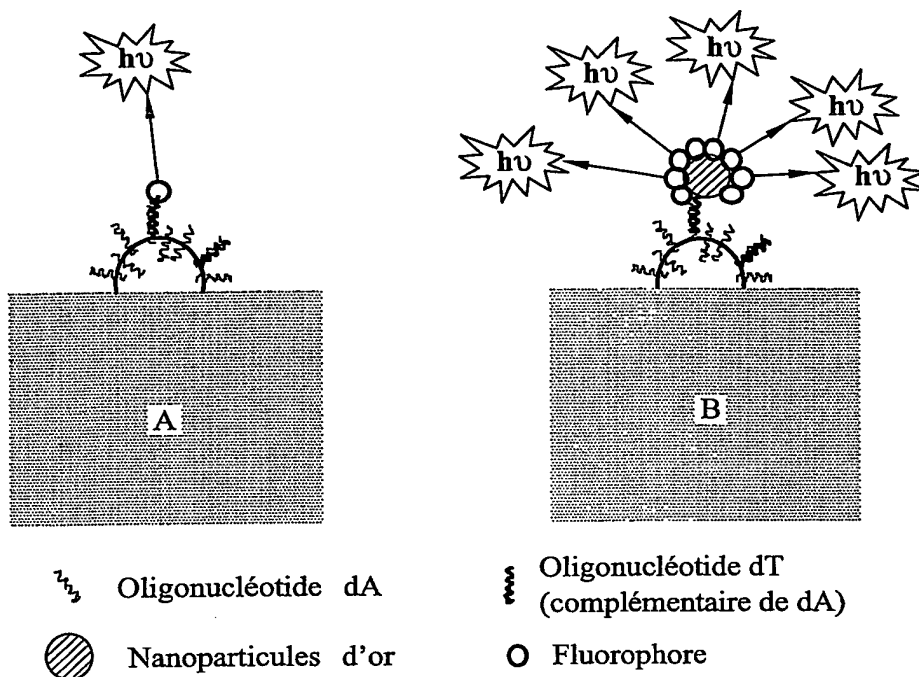


FIG.3

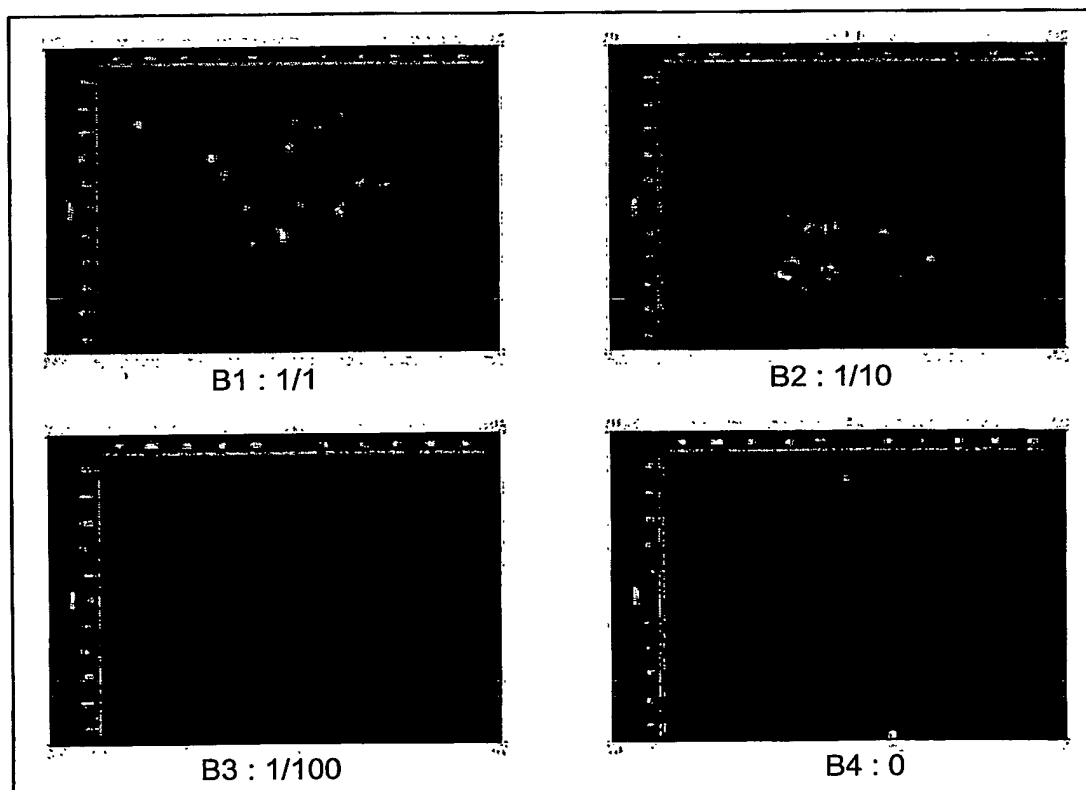


FIG.4



3/4

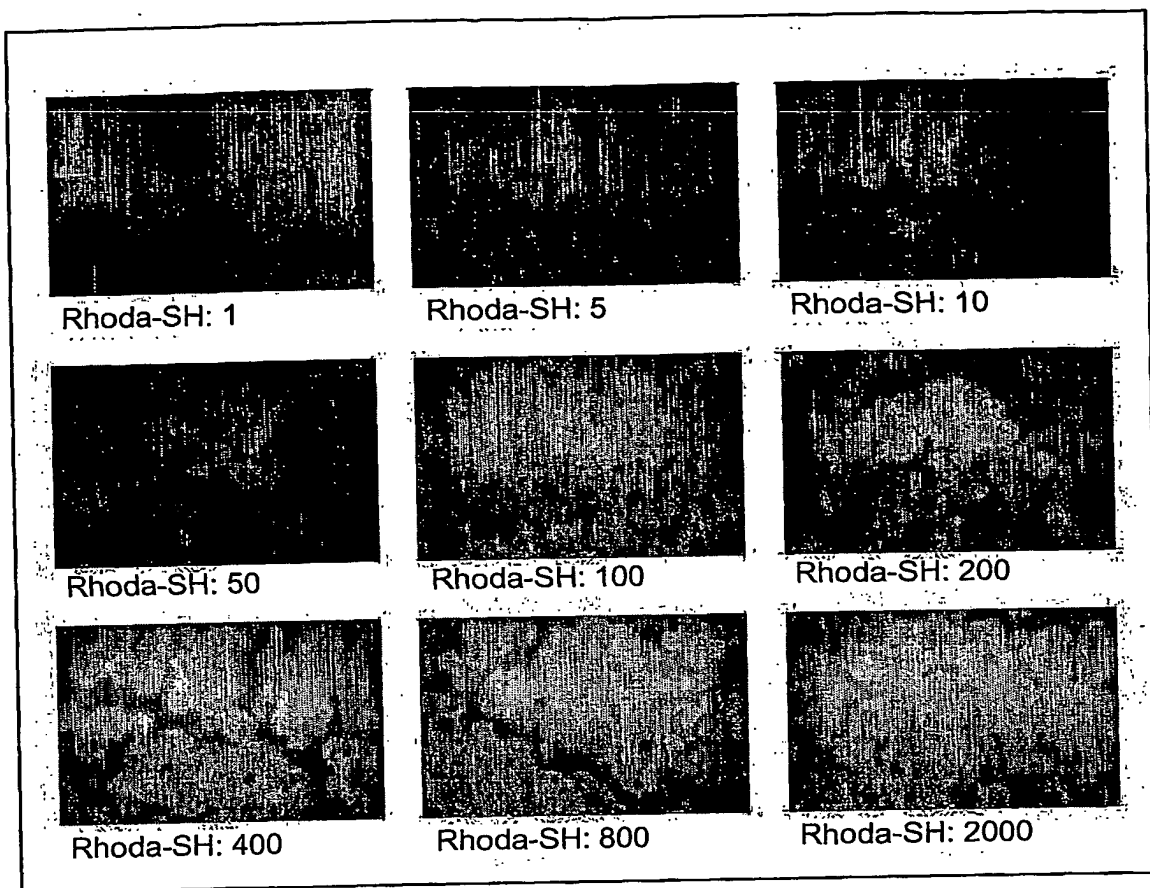


FIG.5

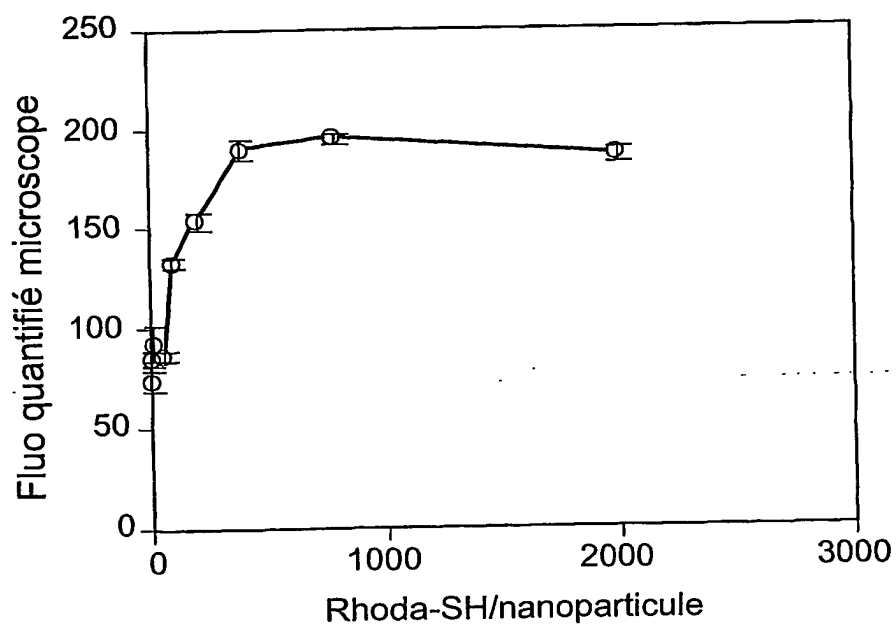


FIG.6

4/4

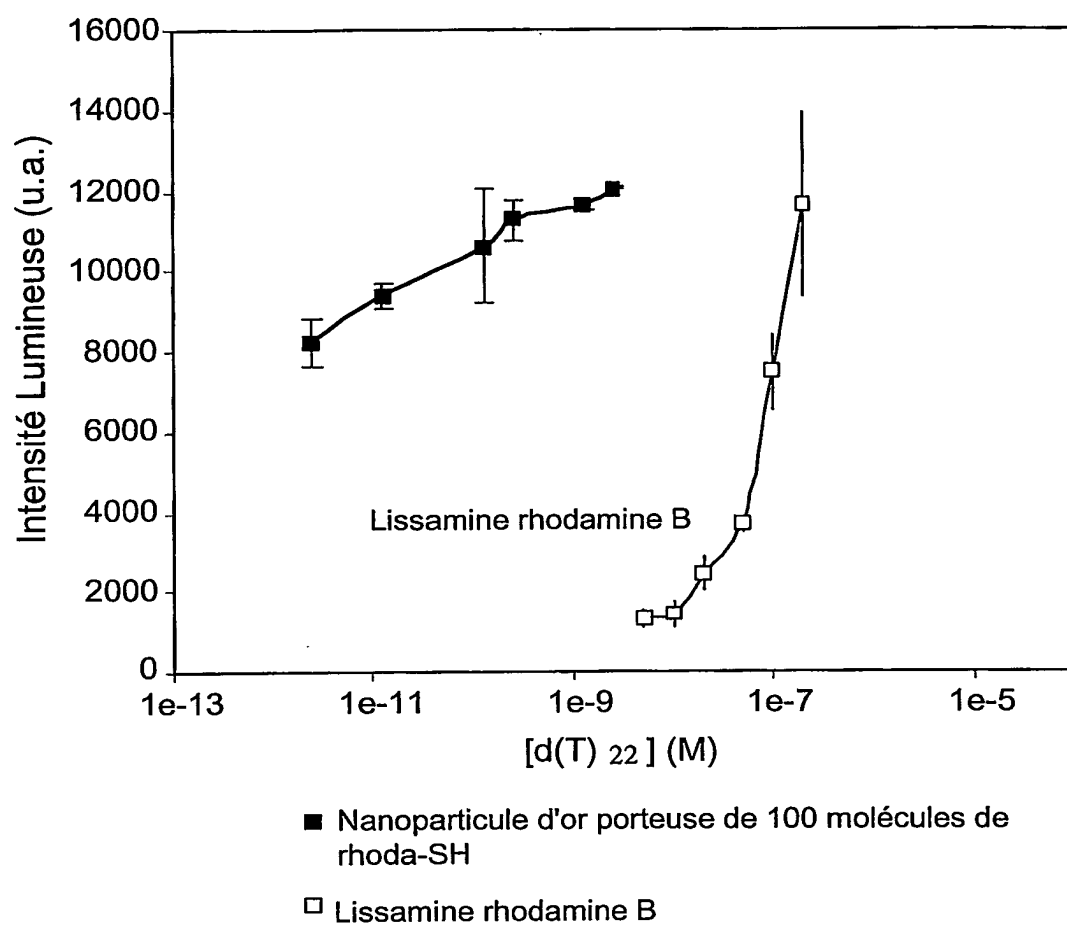


FIG.7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/003039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N33/543 B01J13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/027678 A (EVANS DAVID ; PSYCHIATRIC GENOMICS INC (US)) 3 April 2003 (2003-04-03) page 18, line 17 - page 19, line 3; claims 5,7,9,12	1
X	WO 99/01766 A (UNIV UTRECHT) 14 January 1999 (1999-01-14) cited in the application page 1, lines 26-29; claims 12,29,30	1-22
A	WO 01/39873 A (KEATING CHRISTINE ; UNIV PENNSYLVANIA (US); BROWN KENNETH R (US); NATA) 7 June 2001 (2001-06-07) page 4; claims 1-17	19-22
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 March 2005

Date of mailing of the international search report

05/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cuendet, P

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/003039

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 02/18951 A (CALAME MICHEL ; DUBERTRET BENOIT (US); LIBCHABER ALBERT (US); UNIV ROC) 7 March 2002 (2002-03-07) the whole document</p> <p>-----</p>	1-22

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/003039

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03027678	A	03-04-2003	WO 03027678 A1	03-04-2003
			US 2003059850 A1	27-03-2003
WO 9901766	A	14-01-1999	WO 9901766 A1	14-01-1999
			AU 3360897 A	25-01-1999
WO 0139873	A	07-06-2001	AU 1945901 A	12-06-2001
			EP 1248672 A1	16-10-2002
			JP 2003515438 T	07-05-2003
			WO 0139873 A1	07-06-2001
			US 2003029274 A1	13-02-2003
WO 0218951	A	07-03-2002	AU 9323201 A	13-03-2002
			WO 0218951 A2	07-03-2002
			US 2004002089 A1	01-01-2004

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR2004/003039

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 G01N33/543 B01J13/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 G01N B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 03/027678 A (EVANS DAVID ; PSYCHIATRIC GENOMICS INC (US)) 3 avril 2003 (2003-04-03) page 18, ligne 17 - page 19, ligne 3; revendications 5,7,9,12	1
X	WO 99/01766 A (UNIV UTRECHT) 14 janvier 1999 (1999-01-14) cité dans la demande page 1, ligne 26-29; revendications 12,29,30	1-22
A	WO 01/39873 A (KEATING CHRISTINE ; UNIV PENNSYLVANIA (US); BROWN KENNETH R (US); NATA) 7 juin 2001 (2001-06-07) page 4; revendications 1-17	19-22
	----- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*G\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 mars 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/04/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cuendet, P

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR2004/003039

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 02/18951 A (CALAME MICHEL ; DUBERTRET BENOIT (US); LIBCHABER ALBERT (US); UNIV ROC) 7 mars 2002 (2002-03-07) le document en entier -----</p>	1-22

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demander internationale No

PCT/FR2004/003039

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 03027678	A	03-04-2003	WO 03027678 A1	03-04-2003
			US 2003059850 A1	27-03-2003
WO 9901766	A	14-01-1999	WO 9901766 A1	14-01-1999
			AU 3360897 A	25-01-1999
WO 0139873	A	07-06-2001	AU 1945901 A	12-06-2001
			EP 1248672 A1	16-10-2002
			JP 2003515438 T	07-05-2003
			WO 0139873 A1	07-06-2001
			US 2003029274 A1	13-02-2003
WO 0218951	A	07-03-2002	AU 9323201 A	13-03-2002
			WO 0218951 A2	07-03-2002
			US 2004002089 A1	01-01-2004